

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 53 942.4

**Anmeldetag:** 02. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Erstanmelder:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das metF-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wenner

### Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das metF-Gen verstärkt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga  $\alpha$ -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph

für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-  
5 Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,  
15 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methion-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metF-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der  
20 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine  
25 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der  
5 Methylentetrahydrofolat Reduktase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte  
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,  
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)  
innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
(i) oder (ii) komplementären Sequenz  
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid, enthaltend die Nukleo-  
20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,  
25 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den  
Vektor enthalten oder in denen das metF-Gen verstärkt  
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit  
5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als  
10 Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Methylentetrahydrofolat Reduktase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der  
15 Sequenz der Methylentetrahydrofolat Reduktase aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Methylentetrahydrofolat Reduktase kodieren.

20 Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

25 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte  
30 RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Methylentetrahydrofolat Reduktase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%,  
5 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die  
10 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das metF-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang  
15 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein  
20 entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose,  
25 Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt  
30 für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 5 Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende  
10 Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym  
Methylentetrahydrofolat Reduktase [EC:1.7.99.5]kodierende  
15 metF-Gen von C. glutamicum zu isolieren.

- Zur Isolierung des metF-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten  
20 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank  
25 ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032,  
30 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

5

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich  
10 besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten  
15 langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467,  
20 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder  
25 dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen metF kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin  
30 wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metF-Genproduktes dargestellt.



Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID  
5 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner  
10 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind.

Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben  
15 hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten  
20 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
25 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
30 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
35 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

(International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metF-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei

Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung  
5 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in  
10 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metF-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche  
15 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere  
20 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur  
30 Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise  
35 pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)),

pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma  
5 Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird  
10 anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind  
15 beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-  
20 Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem metF-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen  
25 Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene,  
30 ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 ◦ das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),
- 10 ◦ das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- 15 ◦ das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 20 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metF Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- 25 ◦ das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),

- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),
- 5 ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- 10 ◦ das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des metF-Gens unerwünschte Nebenreaktionen aususchalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen

von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- 5 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
- 10 Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
- 15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 20 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum
- 25 notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines
- 30 einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)



- dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
- 5 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 10 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
- 15 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
- 20 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 25 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
- 30 wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metF-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467)

mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

- 5 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 10 Deutschland).

- Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem 15 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein 20 offenes Leseraster von 1046 Basenpaaren, welches als metF-Gen bezeichnet wurde. Das metF-Gen kodiert für ein Protein von 349 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000363 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1551

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (299)..(1345)

25 &lt;223&gt; metF-Gen

&lt;400&gt; 1

gcgtcaagga cggactcaag tttttcagaa gaattcttat ggccttgccg cgccaggaaa 60  
ccagcccacg cataaagagg acggattcgc tttcctccat tgagcacgaa actgcgaaga 120  
30 tgggccacag catctgtgac aggagcgccg atatcagcaa ttgttagctc ttgagcatcg 180  
aggaactgcg tcaaacgatc tcgcacgacc tccggaaatt tgtcgaggtc aaggtcatgg 240  
35 gcatcgaaac tgctcaagga gacgtccttc aatcgaatag ggggatgcgg gctgaatt 298  
ttg gtg gag gtg aat aaa tgc cag agg cag tcc caa caa aac act ctc 346  
Leu Val Glu Val Asn Lys Cys Gln Arg Gln Ser Gln Gln Asn Thr Leu  
1 5 10 15  
40 atc aca cta aga tac cca ggc atg tcc cta acg aac atc cca gcc tca 394  
Ile Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Met Ser Leu Thr Asn Ile Pro Ala Ser  
20 25 30  
45 tct caa tgg gca att agc gac gtt ttg aag cgt cct tca ccc ggc cga 442  
Ser Gln Trp Ala Ile Ser Asp Val Leu Lys Arg Pro Ser Pro Gly Arg  
35 40 45  
50 gta cct ttt tct gtc gag ttt atg cca ccc cgc gac gat gca gct gaa 490  
Val Pro Phe Ser Val Glu Phe Met Pro Pro Arg Asp Asp Ala Ala Glu  
50 55 60  
55 gag cgt ctt tac cgc gca gca gag gtc ttc cat gac ctc ggt gca tcg 538  
Glu Arg Leu Tyr Arg Ala Ala Glu Val Phe His Asp Leu Gly Ala Ser  
65 70 75 80  
ttt gtc tcc gtg act tat ggt gct ggc gga tca acc cgt gag aga acc 586  
Phe Val Ser Val Thr Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Thr Arg Glu Arg Thr  
85 90 95

5	tca cgt att gct cga cga tta gcg aaa caa ccg ttg acc act ctg gtg Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Ala Lys Gln Pro Leu Thr Thr Leu Val 100 105 110	634
10	cac ctg acc ctg gtt aac cac act cgc gaa gag atg aag gca att ctt His Leu Thr Leu Val Asn His Thr Arg Glu Glu Met Lys Ala Ile Leu 115 120 125	682
15	cgg gaa tac cta gag ctg gga tta aca aac ctg ttg gcg ctt cga gga Arg Glu Tyr Leu Glu Leu Gly Leu Thr Asn Leu Ala Leu Arg Gly 130 135 140	730
20	gat ccg cct gga gac cca tta ggc gat tgg gtg agc acc gat gga gga Asp Pro Pro Gly Asp Pro Leu Gly Asp Trp Val Ser Thr Asp Gly Gly 145 150 155 160	778
25	ctg aac tat gcc tct gag ctc atc gat ctt att aag tcc act cct gag Leu Asn Tyr Ala Ser Glu Leu Ile Asp Leu Ile Lys Ser Thr Pro Glu 165 170 175	826
30	ttc cgg gaa ttc gac ctc ggt atc gcc tcc ttc ccc gaa ggg cat ttc Phe Arg Glu Phe Asp Leu Gly Ile Ala Ser Phe Pro Glu Gly His Phe 180 185 190	874
35	cgg gcg aaa act cta gaa gaa gac acc aaa tac act ctg gcg aag ctg Arg Ala Lys Thr Leu Glu Glu Asp Thr Lys Tyr Thr Leu Ala Lys Leu 195 200 205	922
40	cgt gga ggg gca gag tac tcc atc acg cag atg ttc ttt gat gtg gaa Arg Gly Gly Ala Glu Tyr Ser Ile Thr Gln Met Phe Phe Asp Val Glu 210 215 220	970
45	gac tac ctg cga ctt cgt gat cgc ctt gtc gct gca gac ccc att cat Asp Tyr Leu Arg Leu Arg Asp Arg Leu Val Ala Ala Asp Pro Ile His 225 230 235 240	1018
50	ggt gcg aag cca atc att cct ggc atc atg ccc att acc gag ctg cgg Gly Ala Lys Pro Ile Ile Pro Gly Ile Met Pro Ile Thr Glu Leu Arg 245 250 255	1066
55	tct gtg cgt cga cag gtc gaa ctc tct ggt gct caa ttg ccg agc caa Ser Val Arg Arg Gln Val Glu Leu Ser Gly Ala Gln Leu Pro Ser Gln 260 265 270	1114
60	cta gaa gaa tca ctt gtt cga gct gca aac ggc aat gaa gaa gcg aac Leu Glu Glu Ser Leu Val Arg Ala Ala Asn Gly Asn Glu Glu Ala Asn 275 280 285	1162
65	aaa gac gag atc cgc aag gtg ggc att gaa tat tcc acc aat atg gca Lys Asp Glu Ile Arg Lys Val Gly Ile Glu Tyr Ser Thr Asn Met Ala 290 295 300	1210
70	gag cga ctc att gcc gaa ggt gcg gaa gat ctg cac ttc atg acg ctt Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gly Ala Glu Asp Leu His Phe Met Thr Leu 305 310 315 320	1258

aac ttc acc cgt gca acc caa gaa gtg ttg tac aac ctt ggc atg gcg 1306  
 Asn Phe Thr Arg Ala Thr Gln Glu Val Leu Tyr Asn Leu Gly Met Ala  
 325 330 335

5 cct gct tgg gga gca gag cac ggc caa gac gcg gtg cgt taagccctct 1355  
 Pro Ala Trp Gly Ala Glu His Gly Gln Asp Ala Val Arg  
 340 345

10 taggaatcat gaagggggag ggcggtgatc aatacggcaa acggccgttg atccccgtca 1415  
 aacctaaact gcctgagcaa gtcagtgaag ccgagagagc gatacaggct aaacgcatgg 1475  
 ttgcctcat cgtcgacctc ggggtgtagac aaaatggcaa aagtgttttg tttgtctttt 1535

15 aacagttcat gcatca 1551

<210> 2  
 <211> 349  
 20 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2  
 25 Leu Val Glu Val Asn Lys Cys Gln Arg Gln Ser Gln Gln Asn Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Met Ser Leu Thr Asn Ile Pro Ala Ser  
 20 25 30  
 30 Ser Gln Trp Ala Ile Ser Asp Val Leu Lys Arg Pro Ser Pro Gly Arg  
 35 40 45  
 Val Pro Phe Ser Val Glu Phe Met Pro Pro Arg Asp Asp Ala Ala Glu  
 50 55 60  
 35 Glu Arg Leu Tyr Arg Ala Ala Glu Val Phe His Asp Leu Gly Ala Ser  
 65 70 75 80  
 40 Phe Val Ser Val Thr Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Thr Arg Glu Arg Thr  
 85 90 95  
 Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Ala Lys Gln Pro Leu Thr Thr Leu Val  
 100 105 110  
 45 His Leu Thr Leu Val Asn His Thr Arg Glu Glu Met Lys Ala Ile Leu  
 115 120 125  
 Arg Glu Tyr Leu Glu Leu Gly Leu Thr Asn Leu Leu Ala Leu Arg Gly  
 130 135 140  
 50 Asp Pro Pro Gly Asp Pro Leu Gly Asp Trp Val Ser Thr Asp Gly Gly  
 145 150 155 160  
 55 Leu Asn Tyr Ala Ser Glu Leu Ile Asp Leu Ile Lys Ser Thr Pro Glu  
 165 170 175  
 Phe Arg Glu Phe Asp Leu Gly Ile Ala Ser Phe Pro Glu Gly His Phe  
 180 185 190

Arg Ala Lys Thr Leu Glu Glu Asp Thr Lys Tyr Thr Leu Ala Lys Leu  
 195 200 205  
 5 Arg Gly Gly Ala Glu Tyr Ser Ile Thr Gln Met Phe Phe Asp Val Glu  
 210 215 220  
 Asp Tyr Leu Arg Leu Arg Asp Arg Leu Val Ala Ala Asp Pro Ile His  
 225 230 235 240  
 10 Gly Ala Lys Pro Ile Ile Pro Gly Ile Met Pro Ile Thr Glu Leu Arg  
 245 250 255  
 Ser Val Arg Arg Gln Val Glu Leu Ser Gly Ala Gln Leu Pro Ser Gln  
 260 265 270  
 15 Leu Glu Glu Ser Leu Val Arg Ala Ala Asn Gly Asn Glu Glu Ala Asn  
 275 280 285  
 Lys Asp Glu Ile Arg Lys Val Gly Ile Glu Tyr Ser Thr Asn Met Ala  
 290 295 300  
 20 Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gly Ala Glu Asp Leu His Phe Met Thr Leu  
 305 310 315 320  
 25 Asn Phe Thr Arg Ala Thr Gln Glu Val Leu Tyr Asn Leu Gly Met Ala  
 325 330 335  
 Pro Ala Trp Gly Ala Glu His Gly Gln Asp Ala Val Arg  
 340 345  
 30

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus  
der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
  - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
    - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder



(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
(i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein  
Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID  
No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das metF-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.
- 10 8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die  
einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß  
Anspruch 1 trägt.
- 15 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte  
durchführt:
- 20 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das metF-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem  
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der  
Plasmidvektor die für das metF-Gen kodierende  
Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des  
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das metF-Gen  
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere  
überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen  
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für  
das das Polynukleotid metF kodiert.
- 20 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,  
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
25 aus der Gruppe
- 15.1 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 30 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
Gen pgk,

- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen  
pyc,
- 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende  
Gen tpi
- 5 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase  
kodierende Gen metA
- 15.7 das für die Cystahionin-gamma-Synthase  
kodierende Gen metB
- 10 15.8 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende  
Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase  
kodierende Gen glyA
- 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase  
kodierende Gen metY

15

verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,  
20 coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe

25

- 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen  
thrB
- 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen  
ilvA
- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen  
thrC

- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase  
kodierende Gen ddh
- 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende Gen pck
- 5 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase  
kodierende Gen pgi
- 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- abschwächt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen  
der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 15 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um  
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene  
zu isolieren, die für die Methylentetrahydrofolat  
Reduktase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der  
Sequenz des Methylentetrahydrofolat Reduktase Gens  
aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass man die  
20 Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4  
als Hybridisierungssonden einsetzt.

**Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen****Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der  
5 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metF-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.